

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



**EVALUACIÓN DE *Piper nigrum* (PIMIENTA NEGRA) Y SU POTENCIAL
APLICACIÓN EN ODONTOPEDIATRÍA**

POR

C.D. MARÍA ANDREA GUAJARDO BARBOSA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE
ODONTOPEDIATRÍA**

JUNIO, 2019

**EVALUACIÓN DE *Piper nigrum* (PIMIENTA NEGRA) Y SU POTENCIAL
APLICACIÓN EN ODONTOPEDIATRÍA**

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontopediatría

C.D. MARÍA ANDREA GUAJARDO BARBOSA

Comité de Tesis

Dra. Sonia Martha López Villarreal
Presidente

Dra. María Argelia Akemi Nakagoshi Cepeda
Secretario

Dr. Jaime Adrián Mendoza Tijerina
Vocal

**EVALUACIÓN DE *Piper nigrum* (PIMIENTA NEGRA) Y SU POTENCIAL
APLICACIÓN EN ODONTOPEDIATRÍA**

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontopediatría

C. D. MARÍA ANDREA GUAJARDO BARBOSA

TESISTA

Comité de Tesis

DRA. MARÍA ARGELIA AKEMI NAKAGOSHI CEPEDA

DIRECTOR DE TESIS

DRA. SONIA MARTHA LÓPEZ VILLARREAL

CODIRECTOR DE TESIS

DRA. LAURA ELENA VILLARREAL GARCÍA

ASESORA ESTADÍSTICA

DR. GUSTAVO ISRAEL MARTÍNEZ GONZÁLEZ

ASESOR ESTADÍSTICO

DR. DAVID GILBERTO GARCÍA HERNANDEZ

DIRECTOR EXTERNO

AGRADECIMIENTOS

Gracias **Dios**, por qué todo lo que soy y tengo viene de ti. Gracias por concederme los dones y medios necesarios para culminar con éxito este proyecto, por las personas tan valiosas que has puesto en mi camino y por las experiencias tan bellas que me has permitido vivir.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que contribuyeron a mi preparación académica y a que me apoyaron durante la realización de este proyecto.

A la **Dra. Akemi Nakagoshi**, mi directora de tesis, por su valiosa asesoría y guía durante la realización del presente trabajo.

A la **Dra. Sonia López**, por transmitirme su pasión por los productos naturales, por su aporte y enseñanzas en todos los aspectos de mi formación. Gracias por ser un ejemplo a seguir.

A la **Dra. Laura Villarreal**, quien con paciencia y dedicación me guío durante las pruebas de laboratorio y me asesoró durante todo el proceso.

Al **Dr. David Gilberto García Hernández**, por su valiosa asesoría y apoyo durante la realización de la parte experimental de este proyecto.

Al **Dr. Gustavo Israel Martínez**, por su asesoría en la estadística de este estudio.

A mis **compañeros de la maestría** por convertirse en mi familia durante los dos años de la maestría. Especialmente a **Yuvisela**, mi compañera de laboratorio, gracias por tu compañía y apoyo durante todas las etapas de este proyecto.

A mis padres, **Olga y Enrique**, por ser un apoyo incondicional en todas las áreas de mi vida. No tengo palabras para agradecerles por todos los sacrificios que han hecho por mí y lo que me han enseñado, los amo.

A mis hermanas, **Ana y Daniela**. Gracias por ser mis mayores porristas y por siempre creer en mí, las amo.

A mis **amigos y familia** por el apoyo moral que siempre me han brindado.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo financiero que me brindo a través de la beca durante mis estudios de posgrado.

Al la **Facultad de Odontología de la UANL**, por ser mi alma mater y la base de mi formación profesional.

Al **Posgrado de Odontopediatría de la UANL**, por ser mi segunda casa por dos años, en los cuales crecí demasiado académica y espiritualmente.

Al **Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS)** por permitirme el uso de su equipo e instalaciones. Su ayuda fue invaluable en el desarrollo de este estudio.

A la **Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL**, por facilitarme el uso de sus instalaciones.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	iii
AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES	v
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE GRÁFICOS	ix
NOMENCLATURA	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	2
3. OBJETIVOS.....	3
3.1 Objetivo General	3
3.2 Objetivos particulares	3
4. ANTECEDENTES.....	4
4.1 Medicina Tradicional.....	4
4.2 Herbolaria	4
4.2.1 Métodos para la aplicación de las plantas	5
4.2.2 Herbolaria en Odontología	6
4.2.3 Técnicas de extracción	11
4.3 Planta de estudio: <i>Piper nigrum</i>	12
4.3.1 Variedades	13
4.3.2 Piperina	13
4.3.3 Propiedades	14
4.4 Principales enfermedades de origen odontológico	15
4.4.1 Caries dental	15
4.4.2 Enfermedad periodontal	15

4.4.3 Maloclusiones y hábitos parafuncionales	16
4.4.3.1 Succión digital	16
4.5 Bacterias de interés odontológico	17
4.5.1 Pruebas antimicrobianas	17
4.6 Evaluación de la toxicidad de las plantas.....	18
4.6.1 Estudios de citotoxicidad <i>in vitro</i>	18
4.6.2 Bioensayo de letalidad frente a <i>Artemia Salina</i>	18
5. MÉTODOS.....	20
5.1 Obtención y preparación del material vegetal y el extracto	20
5.2 Análisis Fitoquímico	21
5.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana	21
5.3.1 Difusión en disco de agar	21
5.3.2 Concentración Mínima Inhibitoria	22
5.4 Ensayo de letalidad contra <i>Artemia salina</i>	23
6. RESULTADOS	25
6.1 Pruebas fitoquímicas	25
6.2 Evaluación de actividad antibacteriana contra <i>S. mutans</i> y <i>S. sobrinus</i>	28
6.2.1 Difusión de disco en agar	28
6.2.2 Concentración mínima inhibitoria	32
6.3 Ensayo de letalidad en <i>Artemia salina</i>	35
7. DISCUSIÓN	37
8. CONCLUSIONES.....	39
9. LITERATURA CITADA	40
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	45

LISTA DE TABLAS

No.	Figura	Página
1	<i>Piper nigrum</i>	12
2	<i>Extractos en incubadora orbital</i>	20
3	<i>Sembrado mediante técnica de estría</i>	21
4	<i>Prueba de difusión de disco en agar</i>	22
5	<i>Espectrofotómetro modelo SmartSpec Plus marca Bio-Rad®</i>	23
6	<i>Grupo carboxilo</i>	26
7	<i>Oxidrilos fenólicos (Taninos)</i>	26
8	<i>Esteroles y triptenos</i>	26
9	<i>Carbohidratos</i>	27
10	<i>Sesquiterpenlactonas</i>	27
11	<i>Grupo Carbonilo</i>	27
12	<i>Flavonoides</i>	28
13	<i>Alcaloides</i>	28
14	<i>Placas de 96 pozos para MIC, sin reactivo MTT</i>	35
15	<i>Placa de 96 pozos para MIC con reactivo MTT</i>	35

LISTA DE GRÁFICOS

No.	Gráfico	Página
1	<i>Media de halos de inhibición en la técnica de difusión en disco del extracto etanólico por maceración de Piper nigrum entera contra S. mutans</i>	29
2	<i>Media de halos de inhibición en la técnica de difusión en disco del extracto etanólico por maceración de Piper nigrum molida contra S. mutans</i>	30
3	<i>Media de halos de inhibición en la técnica de difusión en disco del extracto etanólico por maceración de Piper nigrum entera contra S. sobrinus</i>	31
4	<i>Media de halos de inhibición en la técnica de difusión en disco del extracto etanólico por maceración de Piper nigrum molida contra S. sobrinus</i>	32
5	<i>CMI de Pimienta entera contra Streptococcus mutans</i>	36
6	<i>CMI de Pimienta entera contra Streptococcus sobrinus</i>	36
7	<i>CMI de Pimienta molida contra Streptococcus mutans</i>	36
8	<i>CMI de Pimienta molida contra Streptococcus sobrinus</i>	36

NOMENCLATURA

conc	Concentración
°C	Grado centígrado
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
Nm	Nanómetro
μL	Microlitro
mg/mL	Miligramo/Mililitro
μg/μL	Microgramo/Microlitro
%	Por ciento
Abs	Absorbancia
ATCC	American Type Culture Collection
Cel	Células
cm	Centímetros
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
d	Días
DMSO	Dimetilsulfóxido, CH ₃ SOCH ₃
g	Gramos
h	Horas
m	Metros
MeOH	Metanol
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
UFC	Unidades formadoras de colonias

TESISTA: MARÍA ANDREA GUAJARDO BARBOSA

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARÍA ARGELIA AKEMI NAKAGOSHI CEPEDA

CODIRECTOR DE TESIS: DRA. SONIA MARTHA LÓPEZ VILLARREAL

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

EVALUACIÓN DE *Piper nigrum* (PIMIENTA NEGRA) Y SU POTENCIAL
APLICACIÓN EN ODONTOPEDIATRÍA

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: En muchos países *Piper nigrum* es empleada como medicina tradicional por su efecto analgésico y antiinflamatorio. Existe evidencia científica la cual demuestra que tiene poderes antioxidantes y antimutagénicos. Inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas como *S. aureus* y *S. feacalis*. **OBJETIVO:** En el presente trabajo se llevaron a cabo diferentes pruebas para identificar su potencial uso en Odontopediatría. **METODOLOGÍA:** Se obtuvo el extracto de *Piper nigrum* molida y entera mediante la técnica de maceración. Se realizó la caracterización fitoquímica de los extractos obtenidos, se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos contra cepas bacterianas de *S. sobrinus* y *S. mutans* y se determinó la toxicidad de los extractos a través de un ensayo de letalidad contra *Artemia salina*. **RESULTADOS:** Se encontraron compuestos como: grupo carboxilo, oxidrilos fenólicos (taninos) y alcaloides. En la prueba de difusión de disco en agar no se encontró inhibición significativa contra *S. sobrinus*, pero si contra *S. mutans*. CMI de 400 µg/mL para ambos extractos contra *S. mutans*, CMI de 1000 µg/mL para Pimienta entera y 150 µg/mL para Pimienta molida contra *S. sobrinus*. Se obtuvo una DL50 de 41.016 µg/mL para *Piper nigrum* entera y de 16.041 µg/mL para *Piper nigrum* molida, se consideraron ambos extractos como tóxicos. **CONCLUSIONES:** Debido a sus compuestos fotoquímicos se recomienda evaluar su uso como potencial analgésico, hemostático y antiséptico. Además, por su actividad antibacteriana se recomienda su posterior evaluación para la elaboración de coadyuvantes para el mejoramiento y preservación de la salud oral.

TESISTA: MARÍA ANDREA GUAJARDO BARBOSA

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARÍA ARGELIA AKEMI NAKAGOSHI CEPEDA

CODIRECTOR DE TESIS: DRA. SONIA MARTHA LÓPEZ VILLARREAL

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

EVALUATION OF *Piper nigrum* (PIMIENTA NEGRA) Y SU POTENTIAL
APLICATION IN PEDIATRIC DENTISTRY

ABSTRACT

INTRODUCTION: In many countries *Piper nigrum* or black pepper has important medicinal properties and it has been used for traditional medicine in many countries. It possesses analgesic and anti-inflammatory effects and properties that improve respiratory and digestive problems. There is scientific evidence which shows that it has antioxidant and antimutagenic powers. It inhibits the growth of gram-positive bacteria such as *S. aureus* and *S. feacalis*. **OBJECTIVE:** To identify the potential applications in Pediatric Dentistry of *Piper nigrum* extracts, by testing the antimicrobial activity, phytochemical compounds and toxicity level. **METHODOLOGY:** The extract of the dried fruit of *Piper nigrum* was obtained by maceration. Subsequently, photochemical analyzes, antimicrobial evaluation against *S. sobrinus* and *S. mutans* was performed. Finally, the toxicity activity was measured. **RESULTS:** Compounds such as: carboxyl group, phenolic oxidriles (tannins) and alkaloids were found. In the agar diffusion test, no significant inhibition was found against *S. sobrinus*, but the extracts shown activity against *S. mutans*. MIC of 400 µg/mL for both extracts against *S. mutans*, MIC of 1000 µg/mL for whole pepper and 150 µg/mL for ground pepper against *S. sobrinus*. An LD50 of 41,016 µg/mL was obtained for whole *Piper nigrum* and 16,041 µg / mL for ground *Piper nigrum*, both extracts were considered toxic. **CONCLUSION:** Due to its photochemical compounds we recommend evaluating its use as an analgesic, hemostatic and antiseptic agent. In addition, due to its antibacterial potential, we recommend to considerer *Piper nigrum* for the preparation of adjuvants to improve and preserve oral health.

1. INTRODUCCIÓN

La medicina alternativa, tradicional y complementaria se refiere a un gran grupo de prácticas médicas para el cuidado de la salud que no forman parte del sistema formal de salud del país. A pesar de eso, el uso de medicamentos herbarios ha sido ampliamente empleado a lo largo de la historia y en muchos casos ha sido aceptado por las autoridades nacionales de distintos países. Sin embargo, se debe de ser muy cuidadosos con su uso, especialmente en los niños, personas de la tercera edad y mujeres embarazadas.

Está claro la medicina alternativa no suple la medicina moderna, sin embargo, algunas de las plantas medicinales son utilizadas como alternativa de tratamiento para afecciones odontológicas son: tomillo, aloe vera, menta, manzanilla, sanguinaria, echinacea, mirra, romero, propóleo, entre otras. Estas plantas se utilizan generalmente para tratar: caries dental, gingivitis, periodontitis, candidiasis oral, absceso dental, estomatitis herpética y úlceras orales.

En el presente trabajo se realizaron diferentes pruebas para ampliar el conocimiento del potencial de *Piper nigrum*, comúnmente llamada pimienta negra, y como es que se puede aplicar en odontopediatría. Se selecciono esta planta ya que es empleada en muchos países como medicina tradicional por su efecto analgésico y antiinflamatorio, ha demostrado poseer propiedades que mejoran problemas respiratorios y digestivos. Existe evidencia científica la cual demuestra que tiene poderes antioxidantes y antimutagénicos. Inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas como *S. aureus*, *S. feacalis*, sin embargo, no ejerce ninguna acción frente al desarrollo de los hongos.

Ya que las plantas medicinales, así como los medicamentos, no siempre son inofensivas. Se necesitan investigaciones para comprobar su efectividad terapéutica y toxicidad. Es por eso que se realizaron pruebas fitoquímicas, antimicrobianas y de toxicidad.

2. HIPÓTESIS

El extracto etanólico de *Piper nigrum* posee propiedades que favorecen su uso en Odontopediatría.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar mediante diferentes pruebas el extracto etanólico de *Piper nigrum* para determinar su posible aplicación en Odontopediatría

3.2 Objetivos particulares

1. Obtener el extracto etanólico de *Piper nigrum*, molida y entera mediante la técnica de maceración o Soxhlet.
2. Realizar caracterización fitoquímica de forma preliminar de los extractos obtenidos por identificación parcial del compuesto presentes mediante reacciones colorimétricas.
3. Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de *Piper nigrum* molida y entera contra cepas bacterianas de *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus mutans* (ATCC7006u), procedentes del Cepario del Laboratorio de Odontología Integral y Especialidades, del CIDICS, UANL, mediante difusión en disco de agar.
4. Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los extractos obtenidos mediante la técnica de microdilución en placa de 96 pozos, mediante ensayo MTT.
5. Analizar los extractos seleccionados para evaluar la toxicidad mediante el ensayo de Artemia Salina.

4. ANTECEDENTES

4.1 Medicina Tradicional

De acuerdo con la OMS los términos de *medicina alternativa*, *medicina tradicional* y *medicina complementaria* hacen referencia a un conjunto amplio de prácticas de atención en salud que no forman parte de la propia tradición del país y a su vez no están integradas en el sistema de salud. En las últimas décadas la medicina tradicional ha vuelto a alcanzar presencia, debido a el retorno a lo natural y al descubrimiento de los efectos dañinos de fármacos sintéticos (Castro, 2006).

4.2 Herbolaria

La medicina herbolaria se refiere al uso de extractos, de plantas medicinales o sus derivados con fines terapéuticos para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades a través de su empleo. Ya que el hombre, desde el principio de los tiempos, ha hecho lo posible por atenuar sus enfermedades y mejorar su calidad de vida, la medicina herbolaria ha jugado un papel muy importante en esto y le ha permitido curar sus dolencias y enfermedades. El uso tradicional de medicamentos herbarios ha sido empleado a lo largo de la historia. Su uso está bien establecido y ampliamente reconocido como inocuo y eficaz. Además, en muchos países puede ser aceptado por las autoridades nacionales (González y Cardentey, 2016).

Se han utilizado diversas plantas medicinales y aromáticas para el cuidado de salud. Esto se debe a que antes de que existiera la medicina moderna, el hombre dependió de estas plantas para el tratamiento de enfermedades. Actualmente, una parte de la población utiliza la medicina tradicional derivada de las plantas para la atención a la salud. Además, existen países que cuentan con programas de salud en los cuales incluyen la medicina tradicional herbaria (Castro, 2006). Algunos países orientales, como China e India, aún siguen utilizando las plantas medicinales para evitar y combatir múltiples enfermedades (Ballinas *et al*, 2013).

Sin embargo, si se hace un inadecuado uso de las plantas medicinales se puede ocasionar una alteración en la salud. Además, si se utilizan dosis o frecuencias inadecuadas se pueden obtener efectos adversos para la salud. Es de suma importancia, recalcar que la fitoterapia no sustituye a los medicamentos que el médico prescribe, pero es un complemento. Es importante mencionar, que la relación entre lo natural y no saludable no siempre es la misma, ya que en algunos casos las plantas pueden presentar riesgos para la salud (Ballinas *et al*, 2013).

4.2.1 Métodos para la aplicación de las plantas

Existen diversos mecanismos por los cuales nos podemos beneficiar de las propiedades de las plantas medicinales, los cuales se listan en la **Tabla I** (Ballinas *et al*, 2013).

Tabla I. *Mecanismos para la aplicación de plantas medicinales*

Método	Indicaciones
Infusión o tisana	La manera de preparación más común para preparar algunas de las partes más delicadas de la planta (flores, semillas y hojas). La infusión es un líquido que se genera por el contacto del agua caliente con las plantas. De esta manera, se liberan sus componentes. Los componentes se pueden volatilizar, es por eso por lo que se debe de cubrir la tisana. La infusión, por lo general, se bebe caliente.
De cocción	Este es el método que se utiliza para preparar las partes más duras de la planta (raíces, corteza, rizomas y bayas). Estas partes, generalmente, se cortan en trozos y se colocan dentro de un recipiente con agua fría. Se deja hervir, y se mantiene el recipiente tapado. Cuando se obtiene el líquido de cocción, se filtra.
Maceración	La maceración en frío consiste en dejar reposar las hierbas en agua fría dentro de un recipiente.
Tinturas	Ya que una tintura es muy fuerte su consumo se utiliza en dosis muy pequeñas. En esta técnica, se utiliza un líquido formado por

	25% de alcohol y 75% de agua. Se colocan las plantas en un recipiente y se cubren con el líquido. Se deja el recipiente cerrado en un lugar oscuro durante 2 semanas, se recomienda agitar la mezcla cada 2-3 días. Después se filtra la tintura.
Aceite en infusión	Muy comúnmente se utiliza masajes, se pueden utilizar fríos o calientes. El aceite frío se puede elaborar mediante el llenando un recipiente con la hierba y aceite y se deja cerrado y al sol durante 2 semanas. Se requiere que sea agitado diariamente. El aceite caliente se obtiene mediante baño maría, colocando en el recipiente el aceite junto con las hierbas, 3 horas aproximadamente. Finalmente, en ambos procesos, se filtra el aceite.
Jarabes	Estos se obtienen con la adición de miel o azúcar a una infusión, decocción o tintura, esto se hace con el objetivo de mejorar su sabor.

4.2.2 Herbolaria en Odontología

En muchos países la cobertura para la atención odontológica no se ha alcanzado a su totalidad, por eso se ha formalizado el uso de la medicina tradicional, entre ellos la fitoterapia ya que es un recurso accesible para gran parte de la población (Guillen, 2017).

En las enfermedades orales, ha sido ampliamente utilizada la fitoterapia. Es importante la identificación de las plantas, así como el conocimiento de sus partes y las formas de preparación. Todo esto con el objetivo de buscar la forma de integrarlas en el conocimiento formal y científico (Ballinas *et al*, 2013).

Algunas de las plantas medicinales más utilizadas como alternativa de tratamiento para afecciones odontológicas son: tomillo, aloe vera, menta, manzanilla, sanguinaria, echinacea, mirra, romero, propóleo, entre otras (Taheri *et al*, 2011). Estas plantas se

utilizan generalmente para tratar: caries dental, gingivitis, periodontitis, candidiasis oral, absceso dental, estomatitis herpética y úlceras orales (Chaiya *et al*, 2013).

Se han reportado distintas plantas para la atención de enfermedades bucales. En la siguiente tabla se muestran algunas plantas frecuentemente utilizadas en Chiapas y su acción terapéutica (Ballinas *et al*, 2013).

Tabla II. Plantas frecuentemente utilizadas en Chiapas y su acción terapéutica

Plantas con componente activo			
Nombre Científico	Nombre común	Compuestos presentes	Indicación terapéutica
<i>Persea americana Miller</i>	Aguacate	Carbohidratos, proteínas, grasas, taninos, perseitol, metilchavicol, metilengenol, dopamina, esparagina, ácidos málico y acético.	-Colutorio con la infusión de la corteza -Antiséptico -Disminuye la halitosis
<i>Theobroma cacao L.</i>	Cacao	Teobromina, sales minerales, vitaminas y mucílagos.	Para hidratar los labios
<i>Cashua Chenopodium ambrosioides L.</i>	Epazote	Aceite esencial, ascaridol, taninos, terpenos, cimenol, carvenol, Pcimol, limoneno, alcanfor, santonina, salicilato de metilo, quenopodina, glicol, histemina, ácido butírico, peptinas y	-Mejorar la cicatrización bucal -Antiséptico

		sales minerales.	
<i>Psidium guajava L.</i> <i>Myrtaceae</i>	Guayaba	Taninos, guavina, piridoxina, niacina, mirceno, cariofileno, nerolidial, beta bisabolenol, aromancheno, p-selineno, beta sitosterol, triterpenoides, leucociamidinas. Aceites, vitamina A y C, hierro, fósforo y calcio, sales minerales.	Se mastican las hojas frescas para la gingivitis, herpes bucal o periodontitis.
<i>Citrus limon L. Burm</i>	Limón	Citral, linalol, pectina, ácidos cítrico y málico, candineno, felandreno, d-limoneno, citronelal, narcotina, quinolina, estaquidrina, carbohidratos, proteínas, sales de potasio, calcio, fósforo, sodio, hierro, magnesio, manganeso, vitaminas A, B1, B2 y C.	Se emplea para colutorios orales, úlceras, agente cicatrizante y hemostático.
<i>Plantago major L.</i>	Llantén	Heterósidos, aucubina, mucílagos, taninos, pectina, ácido salicílico, flavonoides,	Astringentes, es antiinflamatorio y alivia las úlceras bucales.

		resina, ácido cítrico y oxálico	
<i>MenthapiperitaL</i>	Menta	Mentol, cineol, pineno, limoneno, mentona-piperitona, taninos, acetato de metilo, heterocidos, flavonoides.	Dolor dental, preparar un cocimiento de las hojas estrujadas y puestas en agua hervida y enjaguarse 3 veces al día
<i>Carica papaya L</i>	Papaya	Papaína, carica xantina, papaiotina, capaina, ácido málico, proteínas, grasas, sales de calcio, fósforo, hierro, vitaminas A, B1, B2, y C, taninos y pancreatina	El componente activo que es la papaína se utiliza para la caries. (papacarie)
<i>Ananascomosus (L.) Merrill</i>	Piña	Carbohidratos, proteínas, bromelina; ácidos cítrico; málico y tartárico	Inflamación mucosas bucal
<i>Piñón Jathropa curcas L.</i>	Piñón blanco	Corteza: citrasterol, triterpenos. Hojas: heterósidos, cianogénicos, flavónicos. Semillas: taxoalbúmina	Un algodón empapado con el látex se aplica sobre el diente cariado.
<i>Plantas sin conocimiento de su componente activo</i>			
Nombre Científico	Nombre común		Indicación terapéutica

<i>Solanum melongena</i>	Berenjena	Alivia odontalgias
<i>Nasturtium officinale</i>	Berro	Calma el dolor de muela y las infecciones en las encías
<i>Eugenia Cymbarum</i>	Clavo	Alivia odontalgias
<i>Allium sativum</i> Linnaeus	Ajo	Bactericida, elimina los microbios que producen la caries dental es recomendable para enfermedad periodontal
<i>Zea mays</i>	Maíz	Periodontitis
<i>Laurus nobilis</i>	Laurel	En aplicaciones tópicas en las estomatitis y faringitis
<i>Matricaria chamomilla</i>	Manzanilla	En gargarismos, alivia las irritaciones de la boca, como cataplasma alivia dolores por inflamación
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero	Para evitar y prevenir caries
<i>Origanum vulgare</i>	Orégano	Es un

		antiinflamatorio para la gingivitis.
<i>Salvia officinalis</i>	Salvia	Se utiliza para curar las inflamaciones de las encías y de la boca.
<i>Árnica montana L</i>	Árnica	Enjuagues y gargarismos, como antisépticos bucofaríngeo en estomatitis, amigdalitis y faringitis.
<i>Eucalyptus globosus Labill.</i>	Eucalipto	En gargarismo cura las afecciones a la garganta, desinfecta la boca, propiedades antisépticas, propiedades bacteriostáticas.
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomillo	herpes bucal

4.2.3 Técnicas de extracción

Para obtener un extracto, primero es importante identificar la planta deseada y la parte que contiene los constituyentes útiles. El mecanismo de extracción involucra dos

fenómenos físicos, difusión a través de la pared celular y el lavado de contenidos celulares, una vez que las paredes se han roto. Los métodos tradicionales para la extracción de materiales de plantas incluyen solventes orgánicos para la extracción y técnicas de maceración o Soxhlet (Molnar *et al*, 2017).

La extracción Soxhlet ha sido de los métodos más utilizados para la extracción de plantas por más de un siglo (Subramanian *et al*, 2016). Es utilizada para la extracción de compuestos, generalmente de naturaleza lipídica, contenidos en un sólido, por medio de un solvente afín. El equipo que se utiliza para esta técnica está compuesto por: un extractor, un condensador especial de tipo bulbo y un matraz. Se evapora el solvente y sube hasta el área donde es condensado, al caer regresa a la cámara del solvente y va separando compuestos, hasta que llega a una concentración deseada (Azuola, 2007).

4.3 Planta de estudio: *Piper nigrum*

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Piperales
Familia: Piperaceae
Género: *Piper*
Especie: *Piper nigrum*



Figura 1. *Piper nigrum*

El género *Piper* es uno de los más representativos de la familia *Piperaceae* ya que comprende alrededor de 700 especies distribuidas a nivel mundial, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales. Muchas de estas especies se caracterizan por sus

usos etnobotánicos y sus aplicaciones a nivel alimenticio, agrícola y terapéutico. Algunas especies más representativas son *Piper nigrum*, *Piper methysticum* y *Piper aduncum* (Nitola *et al*, 2016).

Piper nigrum es una especie comúnmente llamada pimienta negra (Khaliq *et al*, 2015). El fruto es una drupa esférica de aproximadamente 5mm de diámetro. Contiene principalmente almidón, su constituyente más importante son las resinas en las que se halla un alcaloide, piperina (León, 1968). Es cultivada por su fruta, que usualmente se seca y se usa como una especial para sazonar (Sindhu *et al*, 2013).

4.3.1 Variedades

Debido a la maduración de los frutos de *Piper nigrum* se pueden clasificar sus variedades de la siguiente manera (Ravindran y Kallapurackal, 2003):

- Pimienta verde, granos totalmente sin madurar
- Pimienta negra, se recoge a la mitad de su maduración
- Pimienta blanca, es el grano totalmente maduro sin cáscara

4.3.2 Piperina

La pimienta negra es una especia conocida por su poder que está constituido por la piperina (Meghwal y Goswami, 2013). La piperina es un alcaloide presente en la pimienta negra. La piperina es responsable de muchos efectos farmacológicos y muchos beneficios para la salud. Especialmente en contra de enfermedades crónicas, como la reducción de la resistencia a la insulina, efectos antiinflamatorios y el mejoramiento de la steatosis hepática (Derosa *et al*, 2016).

Se ha encontrado que la piperina provee protección en contra de las convulsiones epilépticas, radiación y puede ser administrada en pacientes oncológicos antes de recibir quimioterapia (Raman y Gaikar, 2002). Además, se le atribuyen efectos inmunomoduladores, antioxidantes, antiasmáticos, anticancerígenos y antiinflamatorios.

También, se ha encontrado que tiene efectos en p-glicoproteínas y muchos sistemas de enzimas. Esto lleva a efectos de biotransformación que incluyen la quimio prevención, desintoxicación y un aumento en la absorción y biodisponibilidad de plantas y drogas convencionales (Meghwal y Goswami, 2013).

Las nanopartículas sintetizadas de la piperina han demostrado tener una potente acción farmacológica en contra de células cancerígenas (Tammina *et al*, 2017). Exámenes fitoquímicos han indicado que la piperina presenta alcaloides, glicósidos, taninos y flavonoides. Estos compuestos poseen potente actividad antioxidante (Nahak y Sahu, 2011).

4.3.3 Propiedades

Además, de su uso culinario, la pimienta negra tiene importantes propiedades medicinales y preservativas (Meghwal y Goswami, 2013). Es empleada en muchos países como medicina tradicional por su efecto analgésico y antiinflamatorio (Hritcu *et al*, 2015). Los frutos de *Piper nigrum* son altamente valorados por sus agentes curativos en contra del asma, resfriado y problemas respiratorios (Khawas *et al*, 2017). También ha sido utilizada para tratar el vértigo, asma, indigestiones crónicas, toxinas de colon, obesidad, sinusitis, congestión, fiebre, parálisis, desórdenes de artritis, diarrea y cólera (Karsha y Lakshmi, 2013).

Diferentes partes de *Piper nigrum* incluyendo los metabolitos secundarios son utilizados como medicinas, conservadores, insecticidas y agentes de control de larvas (Ahmad *et al*, 2012). La chabamida de *Piper nigrum* tiene efectos antiinflamatorios, es por eso que puede ser un candidato para el tratamiento de enfermedades antiinflamatorias (Tammina *et al*, 2016).

El extracto etanólico de *Piper nigrum* mostro máxima acción inhibitoria en contra de un gran rango de bacterias (Khan, 2013). Acetona y extracto de diclorometano de *Piper nigrum* también se ha reportado que inhibe el crecimiento de bacterias 14ant positivas como *S. aureus*, *B. cereus*, y *S. feacalis* (Karsha y Lakshmi, 2013). El extracto de

etilacetato de *Piper nigrum* ha mostrado inhibición en contra de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *V. cholera* (Singh y Rai, 2013).

El extracto de etilacetato caliente de *Piper nigrum* ha sido reportado como agente inhibidor de *E. coli*, *B. subtilis* pero se encontró que es menos activo y efectivo con *S. aureus* (Joy *et al*, 2014). La sinergia del uso de extracto de plantas *Tinospora cordifolia*, *Ocimum sanctum* y *Piper nigrum* tiene un efecto potencial como agente antimicrobiano en la terapia de infecciones causada por patógenos (Debnath *et al*, 2014).

A pesar de sus efectos positivos se ha encontrado que la acción del aceite esencial de pimienta negra no ejerce ninguna acción frente al desarrollo de los hongos tales como *Fusarium solani*, *Aspergillus flavus* y *Penicillium sp.* (León Mendoza, 2017).

4.4 Principales enfermedades de origen odontológico

4.4.1 Caries dental

La caries dental es una enfermedad multifactorial que afecta a un gran número de personas en el mundo. Esta constituye actualmente la enfermedad más frecuente en el ser humano. Existen algunos elementos de la ecología bucal que pueden favorecer su desarrollo tales como las características del tejido adamantino, aspectos específicos del microbiota oral, el papel de la saliva en el medio bucal y la ingesta de carbohidratos (De Estrada *et al*, 2019).

La caries dental es una consecuencia de cambios que ocurren en el balance natural de la microflora de la placa dental. Esto es ocasionado por la alteración de las condiciones ambientales locales (Garcés *et al*, 2013).

4.4.2 Enfermedad periodontal

La enfermedad periodontal es un término que se refiere a distintas enfermedades que afectan o deterioran a los tejidos de soporte. Estas enfermedades son diversas, entre las

más comunes encontramos a la gingivitis y la periodontitis. La prevalencia mundial de las enfermedades periodontales es muy elevada, es por eso que convierte de gran interés para la salud pública (Zerón, 2018).

4.4.3 Maloclusiones y hábitos parafuncionales

Las maloclusiones orales pueden ser causadas por hábitos orales. Estas, por lo general se desarrollan debido a estímulos físicos y emocionales, como el aburrimiento, el hambre, el estrés, la hiperactividad, el estrés, placer, tristeza y varios tipos de discapacidad en niños (Shetty *et al*, 2015).

4.4.3.1 Succión digital

Se conoce como succión digital al hábito que consiste en introducir uno o más dedos en la cavidad oral, la Asociación Dental Americana considera que el niño puede succionar el pulgar hasta los cuatro años sin dañar sus dientes (Verástegui *et al*, 2014). Sin embargo, la succión digital es uno de los hábitos bucales deformantes más frecuentes en el niño, capaz de producir grandes anomalías dentomaxilofaciales, alteraciones en la función masticatoria y en el estado de salud general (Pérez *et al*, 2013).

El tratamiento del hábito de dedo consiste en determinar individualmente la etiología del hábito, para, con base en esto, elegir el tratamiento y conducta adecuada en cada paciente. Se han descrito diversos tratamientos para controlar los hábitos orales (Verástegui *et al*, 2014). Estos se pueden clasificar en tres categorías: tratamientos psicológicos (persuasivos), utilización de dispositivos ortodóncicos que dificultan el hábito y tratamiento miofuncionales. Además, se han utilizado líquidos aversivos al gusto como tratamiento, los cuales han demostrado eficacia después de ser colocados en el pulgar de los niños que se succionaban dicho dedo. La composición incluye: extracto de pimienta de cayena, ácido cítrico, alcohol isopropílico, acetona y barniz (Ejemplo: Thumb sucking nail biting) (Medina *et al*, 2010).

4.5 Bacterias de interés odontológico

Del gran número de bacterias que se encuentran en la cavidad bucal, los microorganismos pertenecientes al género *Streptococcus*, básicamente las especies *mutans* (con sus serotipos c, e y f) y *sobrinus* han sido asociados a la caries, tanto en animales de experimentación como en humanos. Se conoce que los causantes principales de las caries son los *Streptococcus* del grupo *mutans*, asociados con otras bacterias que pueden modificar el desarrollo de las lesiones. El *Streptococcus mutans*, que ha sido el más aislado en lesiones cariosas humanas, es el primero en colonizar la superficie del diente después de la erupción. Su nombre lo recibe de su tendencia a cambiar de forma, y se puede encontrar como coco o de forma más alargada, como bacilo (Pérez *et al*, 2007).

4.5.1 Pruebas antimicrobianas

El estudio de susceptibilidad *in vitro* a antimicrobianos de los microorganismos patógenos puede realizarse a través de diversos métodos, el de uso más común por los laboratorios de microbiología es el de difusión en agar, estandarizado para microorganismos de crecimiento rápido. El método estandarizado y recomendado se basa en el descrito originalmente por Bauer, llamada también de Sensibilidad en disco, que obtiene resultados cualitativos que correlacionan bien con los resultados cuantitativos obtenidos mediante determinación de concentración inhibitoria mínima (Cona, 2002).

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se define como la concentración más baja de un agente antimicrobiano que evita el crecimiento visible de microorganismos. Al determinar la CMI para patógenos específicos, se obtienen datos que junto con los parámetros farmacocinéticas de los agentes antimicrobianos, posibilita predecir la eficacia del compuesto en el tratamiento de alguna enfermedad específica (Núñez *et al*. 2019).

4.6 Evaluación de la toxicidad de las plantas

4.6.1 Estudios de citotoxicidad *in vitro*

Generalmente, en los estudios de citotoxicidad *in vitro* sobre líneas celulares se emplean diferentes métodos de tinción celular, esto con el fin de estimar de manera indirecta el número de células viables presentes después de un tratamiento. Existen diferentes métodos para realizar estos ensayos:

1. Uso de colorantes, tales como cristal violeta y sulforrodamina B.
2. Los detectores de liberación de componentes constitutivos celulares, los cuales miden la actividad de enzimas tales como lactato deshidrogenasa.
3. Los que miden la función metabólica de las células usando las sales de tetrazolio: MTT, MTS y XXT.

El método más empleado es la reducción metabólica de MTT, basado en la reducción de este. Este es un colorante amarillo, soluble en agua, es reducido tempranamente, en células viables por componentes de la cadena respiratoria, a formazán (cristales azul violeta, insoluble en agua) y su flujo de electrones, esto resulta ser tóxico para las células (Escobar y Rivera, 2010).

4.6.2 Bioensayo de letalidad frente a *Artemia Salina*

El bioensayo de letalidad frente a *Artemia Salina* fue desarrollada en 1982. Este procedimiento consiste en exponer compuestos activos y/o extractos de plantas a nauplios de *Artemia salina* para determinar valores de concentración letal. Estos no advierten una actividad fisiológica o biológica. Sin embargo, son indicadores de toxicidad a nivel celular (Sánchez y Neira, 2011).

Artemia ssp. Son camarones minúsculos de cuerpo blando, de color carmelita y transparentes a la luz; pertenecen al Phylum Arthropoda, clase Crustaceae, subclase Branchiopoda. El género *Artemia* está compuesto por varias especies que se encuentran

distribuidas en todo el mundo en aguas de elevada salinidad, estas son fuente de alimento para peces, pájaros y varios invertebrados. *Artemia* es también útil para predecir actividades plaguicidas y farmacológicas, ya que responde a un amplio rango de compuestos químicos y farmacéuticos (Pino y Jorge, 2010).

El ensayo permite la evaluación rápida y conveniente de extractos crudos, fracciones y compuestos puros. Se basa en la determinación de la mortalidad in vivo de larvas de *Artemia* spp. En 24 horas a dosis iguales o menores de 1000 mg/mL. Los extractos crudos, fracciones o compuestos puros de origen natural son evaluados a concentraciones iniciales de 10, 100 y 1000 mg/mL en viales que contienen 5mL de solución salina y 10 larvas, cada uno es considerado una réplica (tres por concentración). Después de 24 horas, se cuenta el número de larvas muertas. La muerte de las larvas se establece por la falta total de movimientos durante 10 segundos de observación bajo el estereoscopio (Pino y Jorge, 2010).

5. MÉTODOS

5.1 Obtención y preparación del material vegetal y el extracto

El fruto seco de *Piper nigrum* se obtuvo en lugares reconocidos para su venta, se obtuvo en presentación de pimienta negra molida pura (Lote: LH00155) y entera (Lote: LOJ070618). Se obtuvieron los extractos etanólicos de ambas presentaciones mediante la técnica de maceración, para la cual se utilizaron 187g de *Piper nigrum* molida y 200g *Piper nigrum* entera. Se adicionaron 700ml de etanol puro en cada frasco y se colocaron en la incubadora orbital por 7 días. Posteriormente, se filtraron los extractos con filtros Whatman #5. Se coloraron en envases color ambar y se llevó a cabo la evaporación de solvente con calor seco a 60°C por 48 horas continuas.

Figura 2. Extractos en incubadora orbital



5.2 Análisis Fitoquímico

Una vez obtenidos los extractos se realizó el análisis fitoquímico preliminar de los extractos para la identificación parcial de compuestos presentes mediante reacciones colorimétricas. Se evaluó la presencia de: grupo carboxilo, oxidrilos fenólicos (taninos), esteroides y triptenos, carbohidratos, sesquiterpenlactonas, grupo carbonilo, flavonoides y alcaloides.

5.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana

5.3.1 Difusión en disco de agar

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos de *Piper nigrum* contra cepas bacterianas de *S. sobrinus* y *S. mutans* (ATCC7006u), procedentes del Cepario del Laboratorio de Odontología Integral y Especialidades, del CIDICS, UANL, mediante difusión en disco de agar. Se incubó cepa bacteriana de *S. sobrinus* y *S. mutans* en medio Mueller Hinton (MH) a 37°C por 24 horas. Después se tomó una colonia de cada una y se incubaron a 37°C por 24 horas. Posteriormente se tomaron 100µL del medio MH por 24 horas a 37°C contrastando turbidez.

Se inocularon 100 µL de cada cepa y se sembraron mediante la técnica de estría con un cotonete humedecido se distribuyó en medio sólido agar Mueller Hinton.

Figura 3. Sembrado mediante técnica de estría



Se preparó una solución madre para cada uno de los extractos. Las cuales contenían 20 mg de extracto, 500µl de Dimetilsulfóxido (DMSO) y 9500µl de agua bidestilada estéril. Posteriormente, se realizaron las diluciones a diferentes concentraciones (1000µg/µL, 500 µg/µL, 250 µg/µL, 125 µg/µL).

Se colocaron cinco sensidiscos sobre el agar de cada caja Petri, con el inóculo previamente sembrado. Tres sensidiscos con 20 µL de cada extracto a evaluar por triplicado, otro con 20 µL de Clorhexidina al 0.12% (control positivo) y otro con 20 µL de agua bidestilada. Todo este proceso se repitió para cada una de las concentraciones de ambos extractos. Se incubaron las cajas a 37°C durante 36 horas para la posterior evaluación la actividad antimicrobiana.

Figura 4. Prueba de difusión de disco en agar



5.3.2 Concentración Mínima Inhibitoria

Mediante la técnica de microdilución en placas de 96 pozos se determinó la Concentración Mínima Inhibidora de ambos extractos sobre las bacterias de estudio (*S. mutans* y *S. sobrinus*). Se probaron concentraciones de 400, 600, 800, 1000 y 1200 µg/mL de el extracto obtenido de pimienta entera y pimienta molida por triplicado.

También fueron incluidas muestras blanco con medio de cultivo Mueller Hinton, medio con inóculo y medio con controles antes mencionados. Posteriormente la placa fue incubada a 37°C durante 24 h, después de este tiempo las placas se analizan considerando la absorbancia OD600 mediante el Espectrofotómetro modelo SmartSpec Plus marca Bio-Rad®.

Se agregó MTT en cada pocillo para posteriormente realizar un segundo escaneo. Se midió la inhibición del crecimiento bacteriano y se comparó con el grupo de control negativo. Se determinaron las CMI como la dosis más baja de el extracto que inhibió visiblemente el crecimiento del microorganismo.

Figura 5. Espectrofotómetro modelo SmartSpec Plus marca Bio-Rad®



5.4 Ensayo de letalidad contra *Artemia salina*

Para medir la toxicidad de los extractos de *Piper nigrum* molida y entera se realizó el ensayo de letalidad contra *Artemia salina*.

Primero se atemperaron los quistes de *A. salina* y se pesaron 0.1 g. Se depositaron 300 mL agua de mar sintética (40 g de sal de mar, 6 mg de levadura de cerveza, se ajustó pH 7.8, se aforó a 1 L) en una cámara de eclosión, con un lado oscuro y otro iluminado (bombilla eléctrica de 20 W), dividida con un pequeño orificio, se mantuvo por 24 h con aeración constante a 22-29 °C.

Las Artemias eclosionadas se separaron y mantuvieron a las mismas condiciones por 48 h.

Se colocaron una microplaca de 96 pozos con 100 µL de agua de mar en cada pozo más 10 nauplios, se depositan 100 µL de los extractos para tener una concentración final de 100, 250, 500, 750 y 1000 µg/mL y como control negativo agua de mar artificial y positivo KmnO₄ a 400 µg/mL, se incubaron a las mismas condiciones por 24 h.

Se realizó un conteo de los nauplios muertos con ayuda de un estereoscopio y se realizó el análisis estadístico PROBIT para determinar la DL₅₀. Se consideran valores superiores a 1000 µg/mL como no tóxicos, los menores de 1000 pero mayores de 500 µg/mL ligeramente tóxicos y los menores a 500 µg/mL tóxicos (Déciga-Campos *et al*, 2007).

6. RESULTADOS

6.1 Pruebas fitoquímicas

Los resultados obtenidos en las pruebas fitoquímicas fueron los mismos para el extracto etanólico de *Piper nigrum* entera como para el extracto de *Piper nigrum* molida. En ambos extractos se encontraron compuestos como: grupo carboxilo, oxidrilos fenólicos (Taninos) y alcaloides.

Tabla III. Resultados de pruebas fitoquímicas

Prueba	Compuesto a identificar	Comprobación de un precipitado eficiente	Resultado del extracto etanólico de <i>Piper nigrum</i> entera	Resultado del extracto etanólico de <i>Piper nigrum</i> molida
Prueba de bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	Grupo carboxilo	Desprendimiento de burbujas de anhídrido carbónico	Positivo	Positivo
Prueba de cloruro férrico	Oxidrilos fenólicos (Taninos)	Coloración verde oscura o negra	Positivo	Positivo
Prueba de Liebermann-Buchard	Esteroles y triptenos	Coloración azul o morado es positiva para esteroles y color rojizo para triterpenos	Negativo	Negativo
Prueba de la Antrona	Carbohidratos	Anillo azul verdoso o violeta	Negativo	Negativo
Prueba de Bajlet	Sesquiterpenlactonas	Coloración anaranjada o roja oscura	Negativo	Negativo
Prueba de la 2	Grupo carbonilo	Precipitado amarillo, rojo o naranja	Negativo	Negativo
Prueba de Shinoda	Flavonoides	Rojo intenso	Negativo	Negativo
Prueba de Dragendorff (modificado)	Alcaloides	Precipitado naranja	Positivo	Positivo

Figura 6. Grupo carboxilo

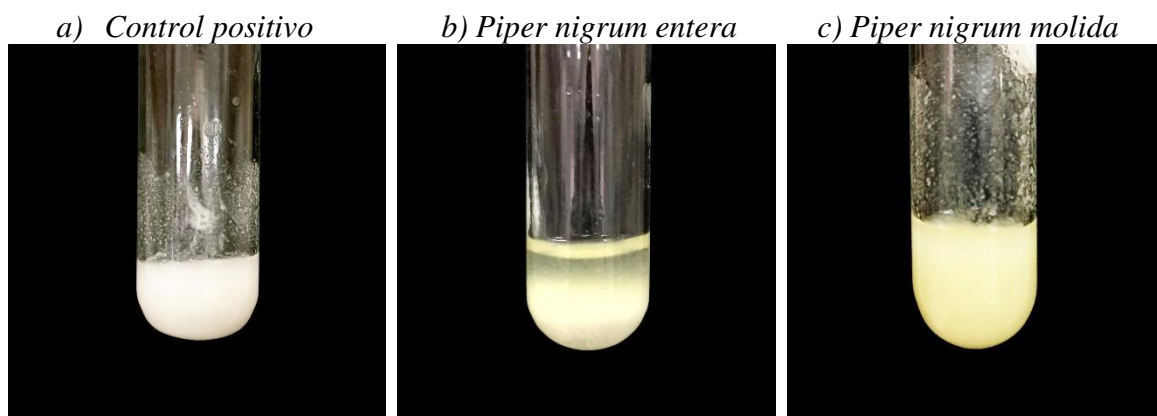


Figura 7. Oxidrilos fenólicos (Taninos)

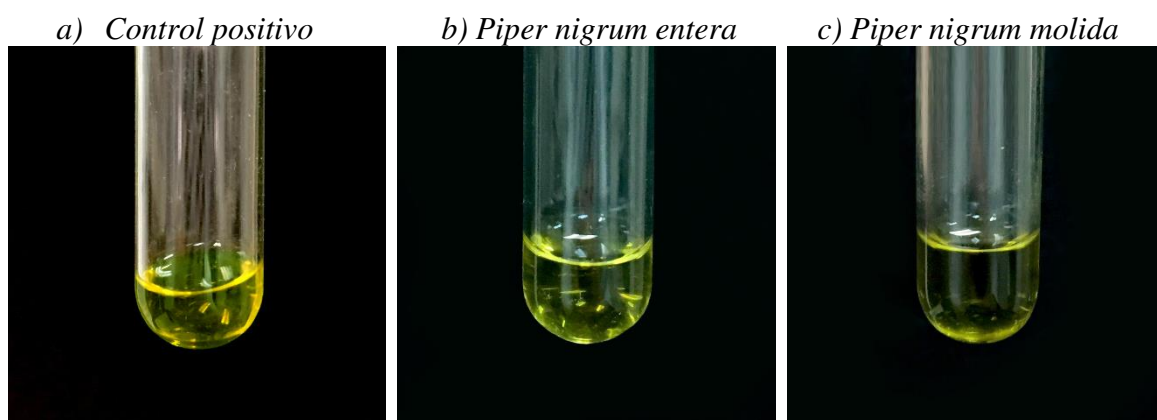


Figura 8. Esteroles y triptenos

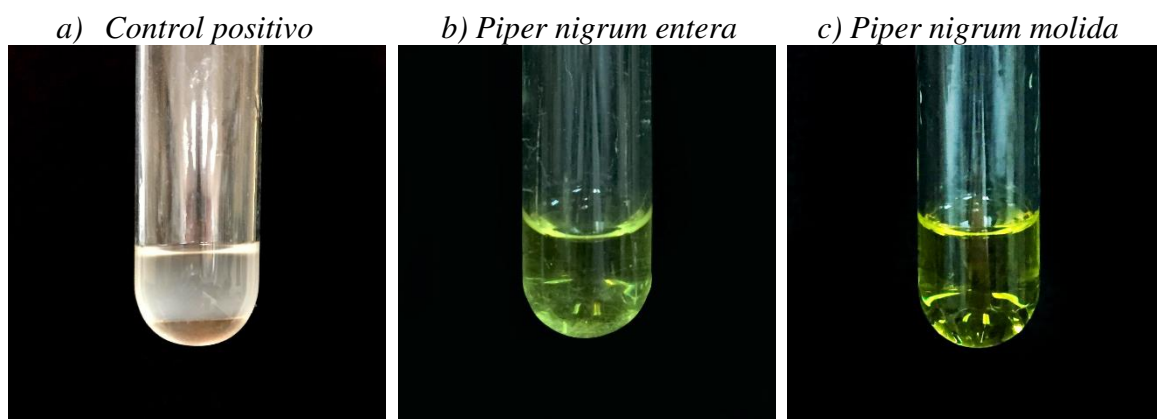


Figura 9. Carbohidratos

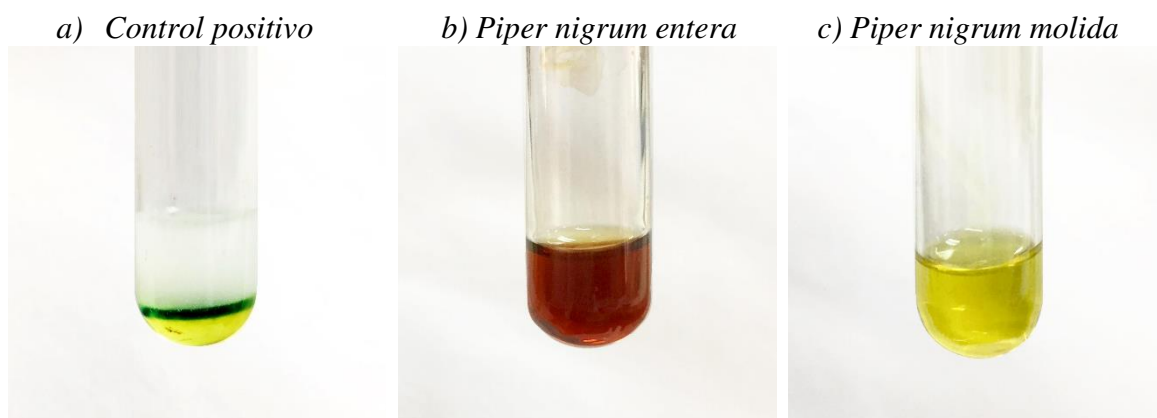


Figura 10. Sesquiterpenlactonas

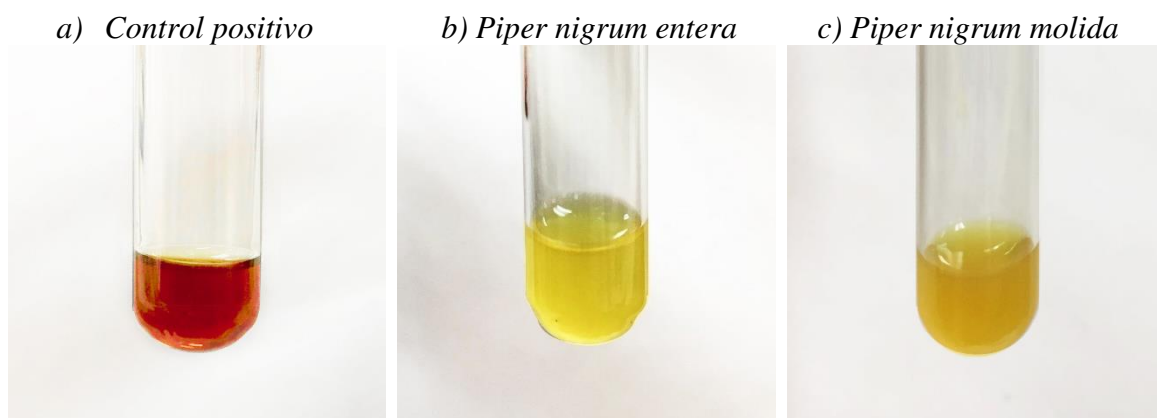


Figura 11. Grupo carbonilo

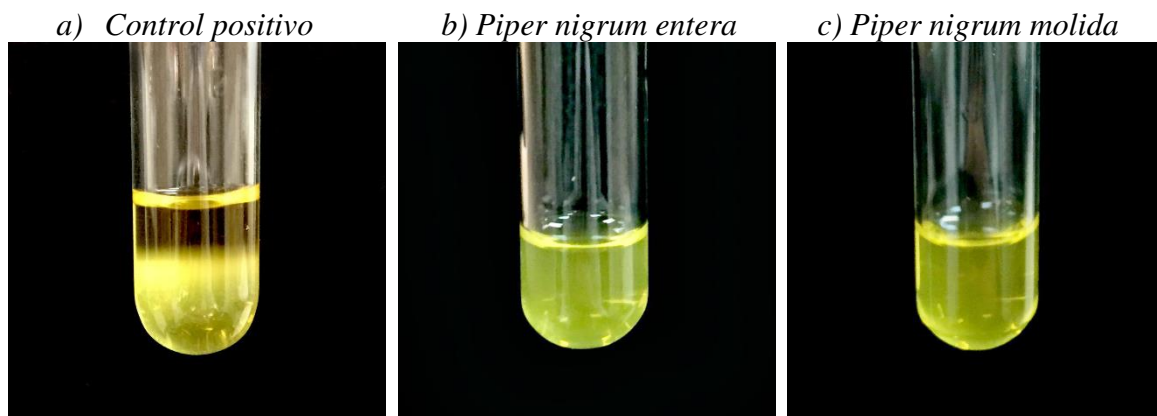


Figura 12. Flavonoides

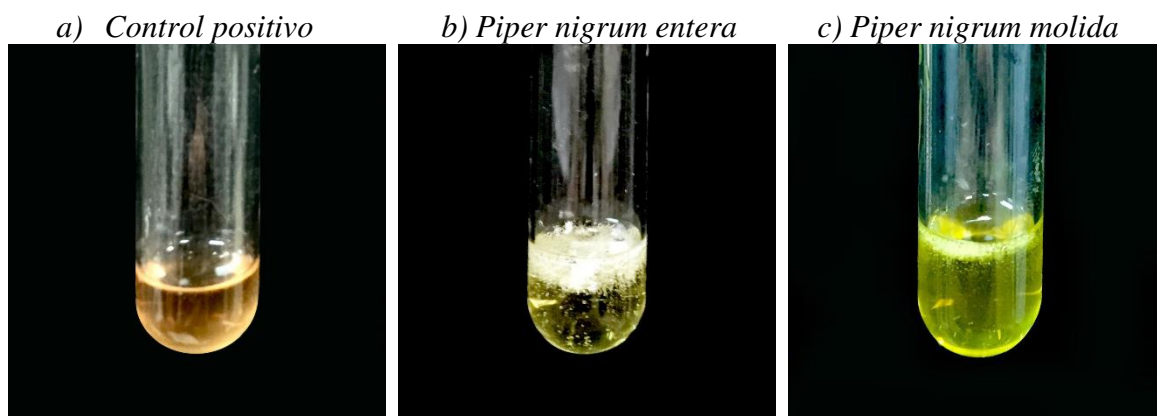
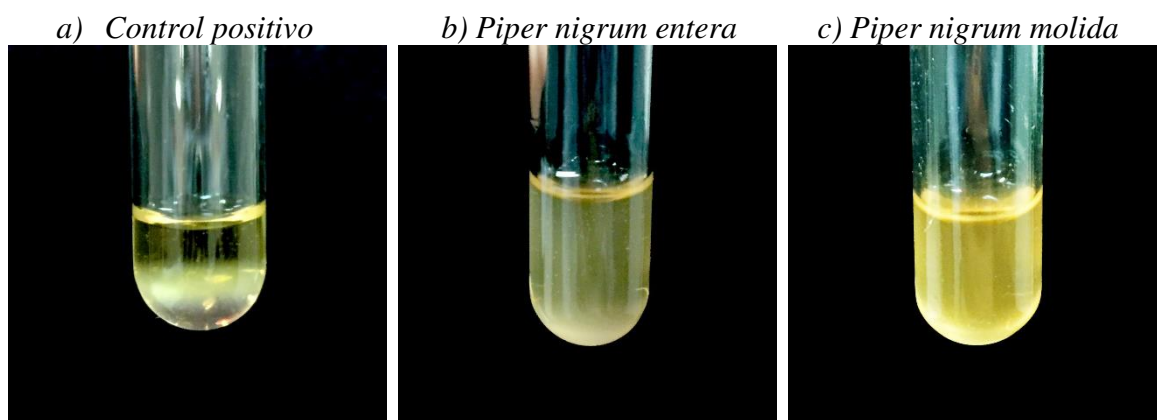


Figura 13. Alcaloides



6.2 Evaluación de actividad antibacteriana contra *S. mutans* y *S. sobrinus*

6.2.1 Difusión de disco en agar

Se realizó la metodología de difusión en disco en agar para evaluar la inhibición de los extractos etanólicos de *Piper nigrum* molida y entera contra *S. mutans* y *sobrinus*, se utilizaron concentraciones de 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml y 1000 µg/ml por triplicado. La actividad antimicrobiana fue obtenida de acuerdo con los halos de inhibición expresados en milímetros (mm). No se encontró inhibición significativa de ninguno de los extractos contra *S. sobrinus* en ninguna de las concentraciones evaluadas. Se encontró mayor inhibición de *Piper nigrum* molida contra *S. mutans* a la

concentración de 1000 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Promedio 9.33m). Los resultados se muestran en las siguientes tablas y gráficas.

Tabla IV. Medición de halos de inhibición en la técnica de difusión en disco del extracto etanólico por maceración de *Piper nigrum* entera contra *S. mutans*

Caja	Concentración del extracto	Control +	Control -	1	2	3	Promedio mm	DS mm	Valor p
1	1000 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	16	6	7.5	6	9	7.5	1.50	0.0003
2	500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	15	6	7.5	6	7.5	7	0.87	<0.0001
3	250 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	16	6	7.5	7	8	7.5	0.50	<0.0001
4	125 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	15	6	6	7	6	6.33	0.58	<0.0001

Gráfico 1. Media de halos de inhibición en la técnica de difusión en disco del extracto etanólico por maceración de *Piper nigrum* entera contra *S. mutans*

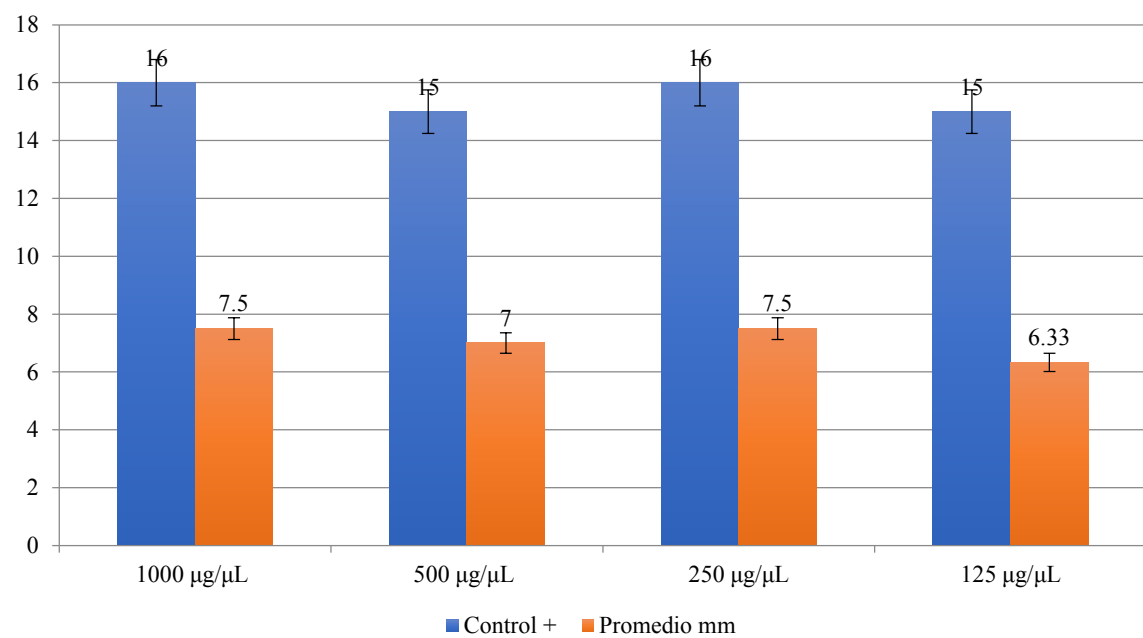


Tabla V. Medición de halos de inhibición en la técnica de difusión en disco del extracto etanólico por maceración de *Piper nigrum* molida contra *S. mutans*

Caja	Concentración del extracto	Control +	Control -	1	2	3	Promedio mm	DS mm	Valor p
1	1000 µg/µL	14	6	9	9	10	9.33	0.58	<0.0001
2	500 µg/µL	16	6	9	8	8	8.33	0.58	<0.0001
3	250 µg/µL	14.5	6	9	8	8	8.33	0.58	<0.0001
4	125 µg/µL	15	6	9	6	6	7	1.73	0.00066

Gráfico 2. Media de halos de inhibición en la técnica de difusión en disco del extracto etanólico por maceración de *Piper nigrum* molida contra *S. mutans*

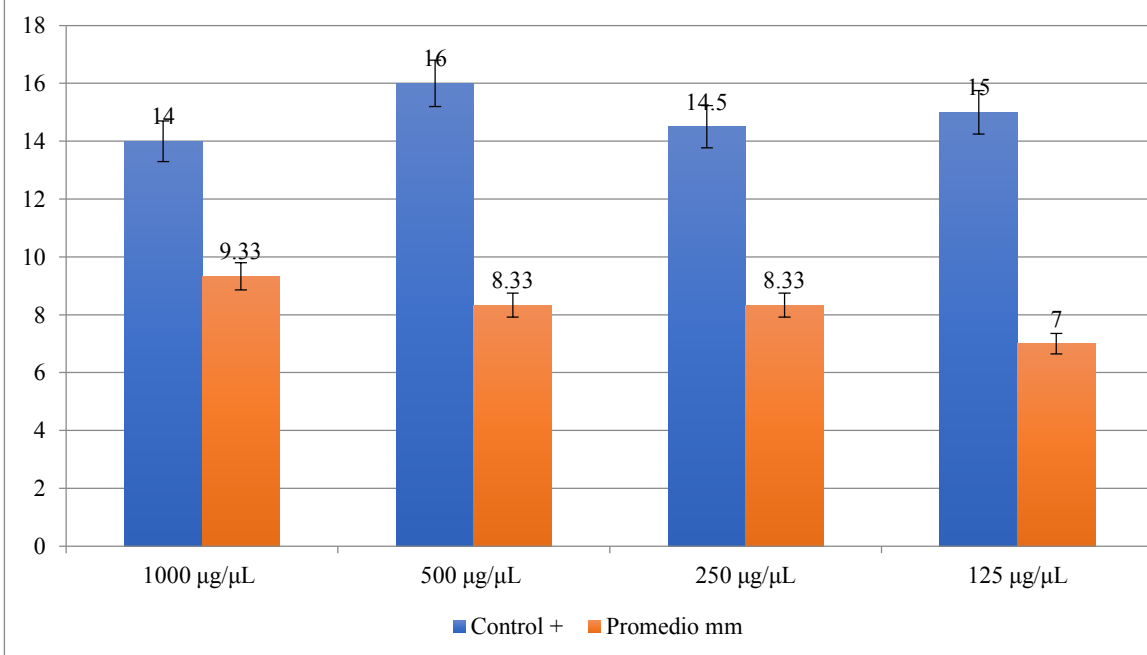


Tabla VI. Medición de halos de inhibición en la técnica de difusión en disco del extracto etanólico por maceración de *Piper nigrum* entera contra *S. sobrinus*

Caja	Concentración del extracto	Control +	Control -	1	2	3	Promedio mm	DS mm	Valor p
1	1000 µg/µL	14.5	6	6	6	6	6	0	<0.0001
2	500 µg/µL	14.5	6	6	6	6	6	0	<0.0001
3	250 µg/µL	13.5	6	6	6	6	6	0	<0.0001
4	125 µg/µL	15.0	6	6	6	6	6	0	<0.0001

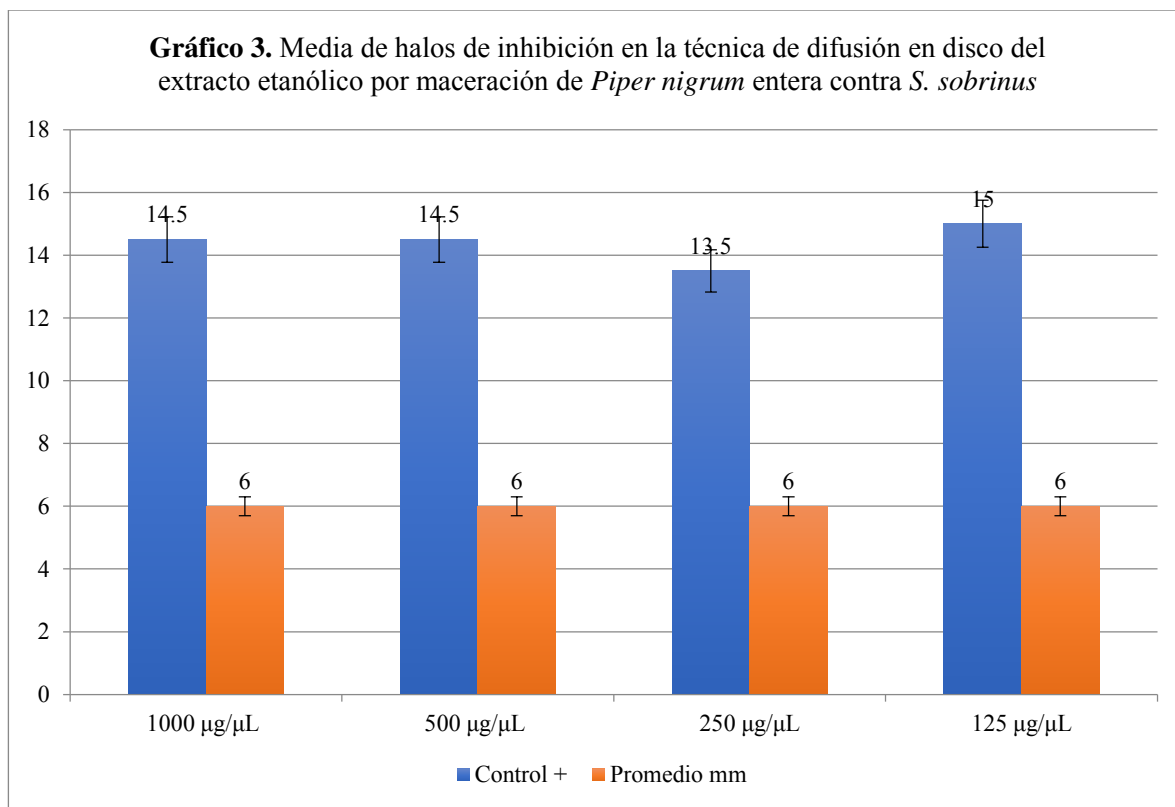
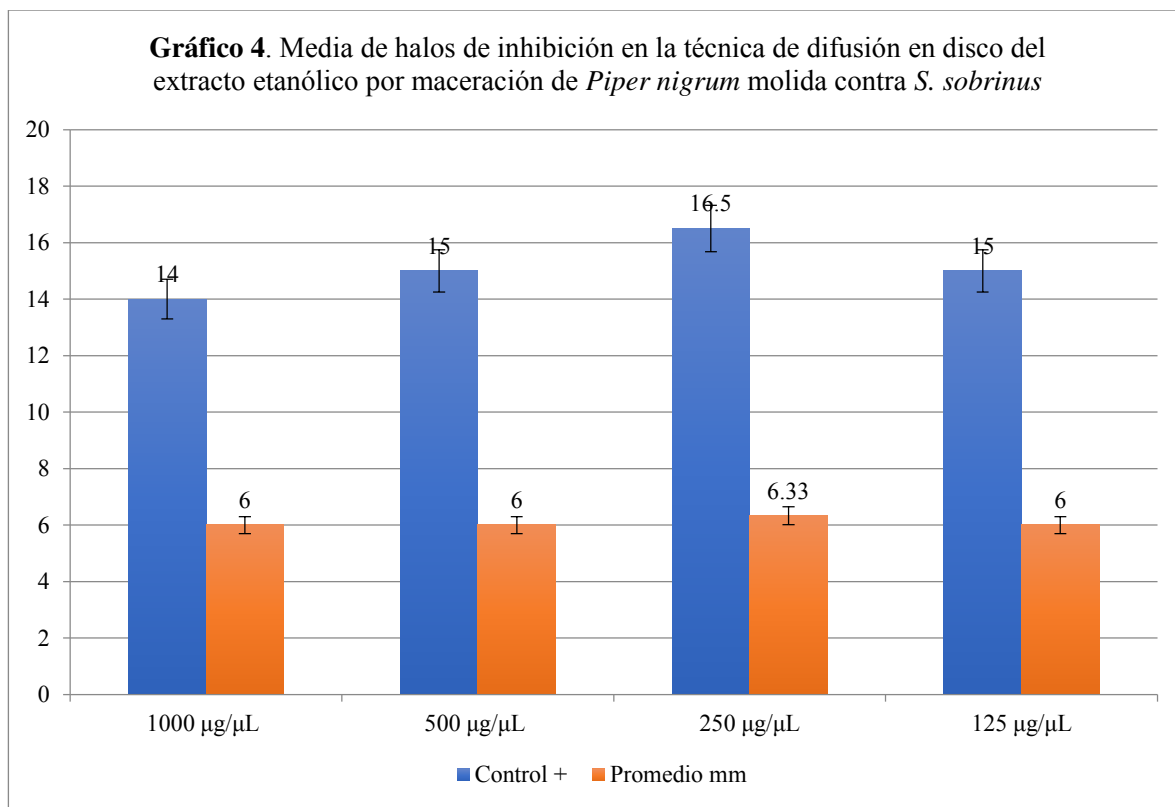


Tabla VII. Medición de halos de inhibición en la técnica de difusión en disco del extracto etanólico por maceración de *Piper nigrum* molida contra *S. sobrinus*

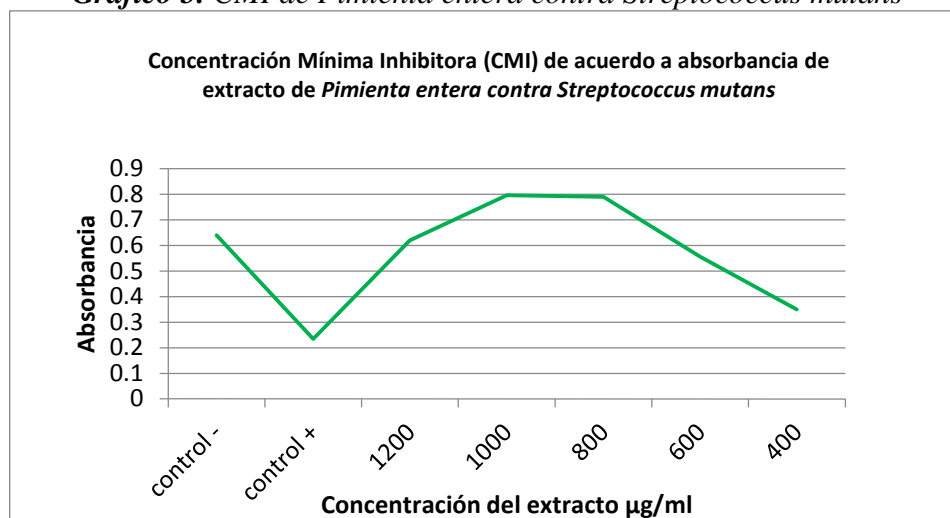
Caja	Concentración del extracto	Control +	Control -	1	2	3	Promedio mm	DS mm	Valor p
1	1000 µg/µL	14	6	6	6	6	6	0	<0.0001
2	500 µg/µL	15	6	6	6	6	6	0	<0.0001
3	250 µg/µL	16.5	7	6	6	6	6.33	0	<0.0001
4	125 µg/µL	15	6	6	6	6	6	0	<0.0001



6.2.2 Concentración mínima inhibitoria

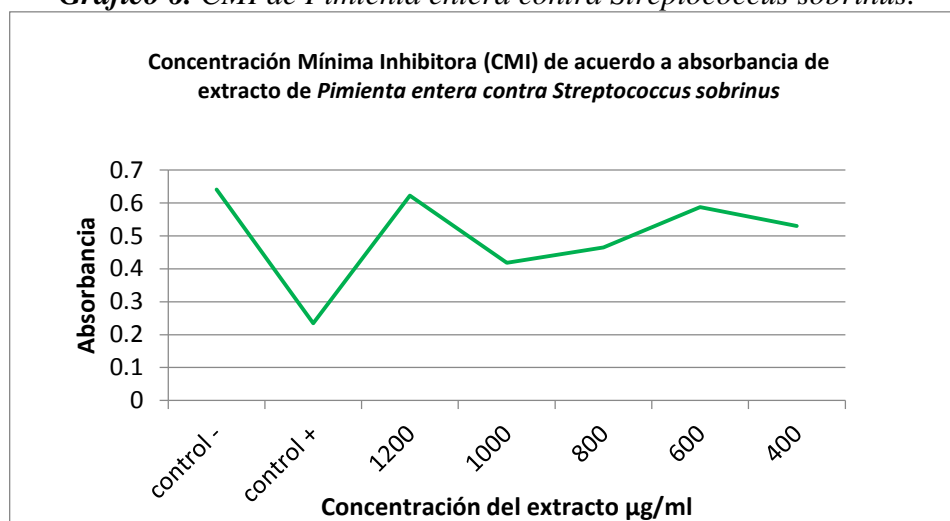
La concentración mínima inhibitoria (CMI), es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación. Para este análisis se consideró como blanco o testigo el medio de cultivo con bacteria de estudio, control negativo etanol al 10%, control positivo Clorhexidina al 0.12%. Las dosis de análisis fueron para ambos extractos: Dosis 1: 1200 µg/mL, Dosis 2: 1000 µg/mL, Dosis 3: 800 µg/mL, Dosis 4: 600 µg/mL y Dosis 5: 400 µg/mL. A continuación, se presentan las gráficas con los resultados obtenidos:

Gráfico 5. CMI de Pimienta entera contra *Streptococcus mutans*



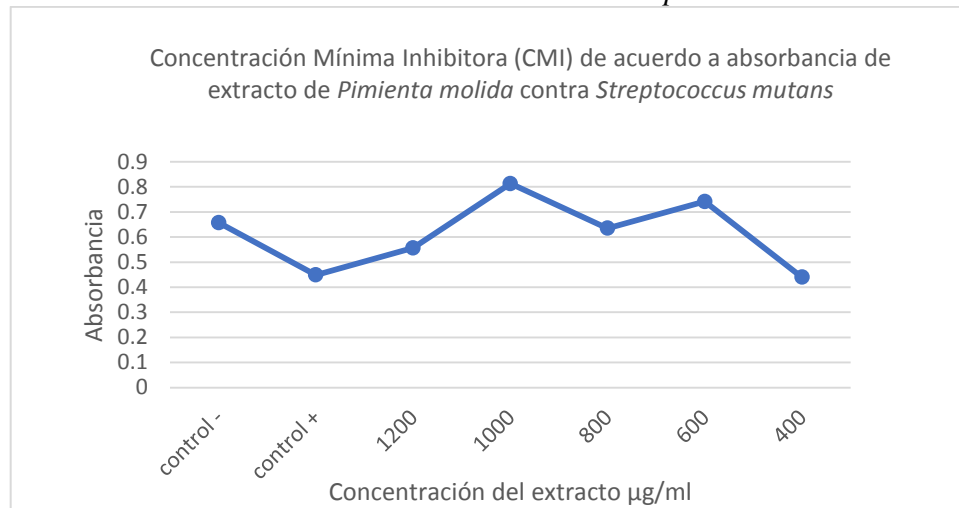
En la revisión del extracto de Pimienta entera con la bacteria de *Streptococcus mutans* la CMI fue de 400 $\mu\text{g/mL}$.

Gráfico 6. CMI de Pimienta entera contra *Streptococcus sobrinus*.



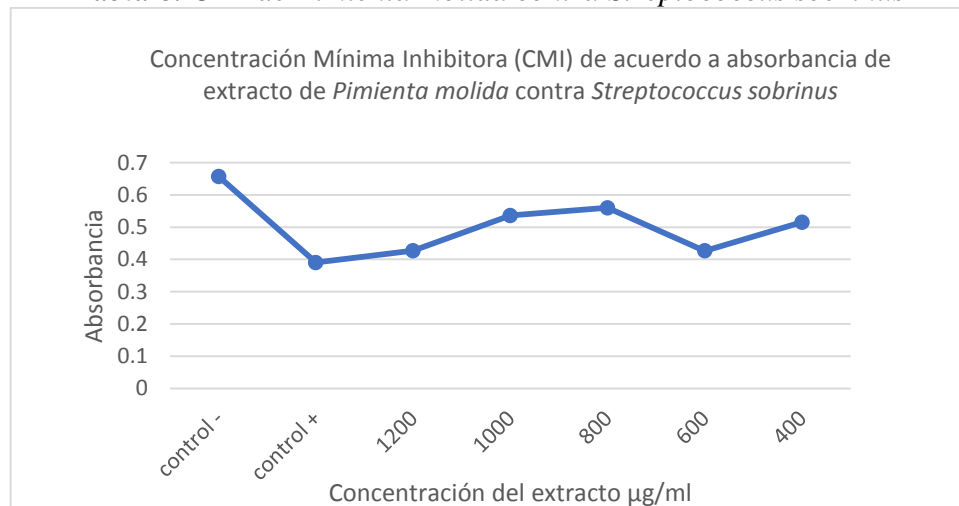
En el análisis del extracto de Pimienta entera frente a la bacteria de *Streptococcus sobrinus* la CMI fue la primera dosis de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 7. CMI de Pimienta molida contra *Streptococcus mutans*.



Para la evaluación del extracto de Pimienta molida frente a la bacteria de *Streptococcus mutans* la CMI de 400 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 8. CMI de Pimienta molida contra *Streptococcus sobrinus*



Para el extracto etanólico de Pimienta molida frente a la bacteria de *Streptococcus sobrinus* la CMI de 150 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 14. Placas de 96 pozos para MIC, sin reactivo MTT:

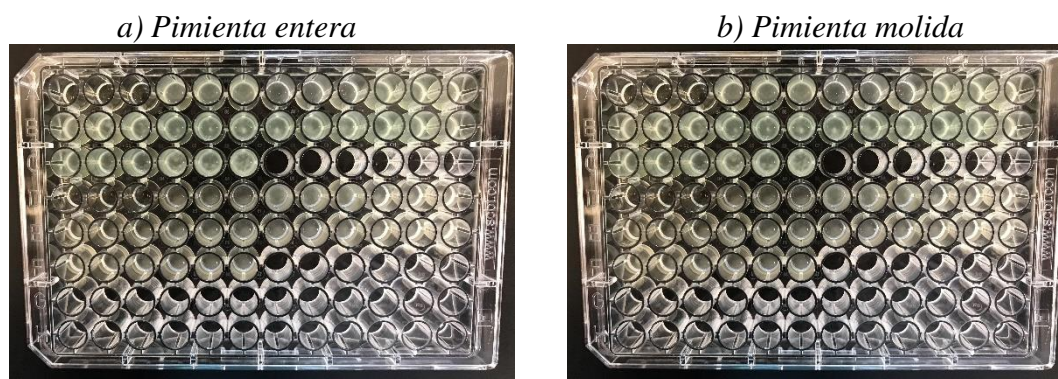
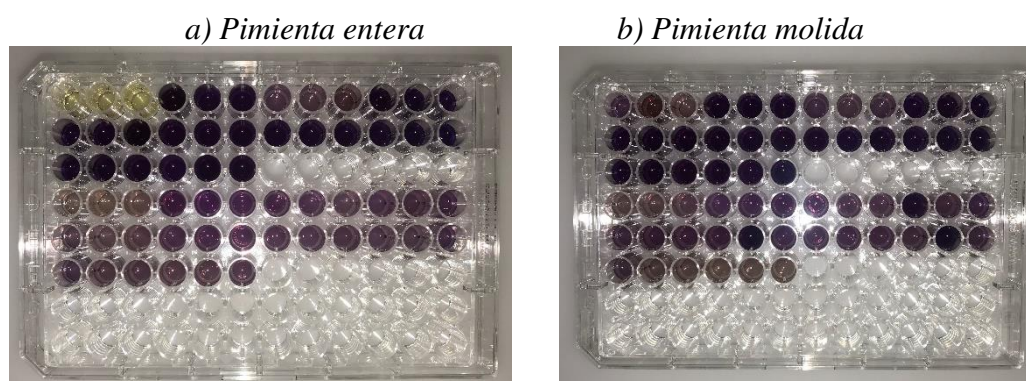


Figura 15. Placa de 96 pozos para MIC con reactivo MTT:



6.3 Ensayo de letalidad en *Artemia salina*

Se realizó una regresión PROBIT en el paquete estadístico IBM SPSS Statistics, obteniendo una Dosis Letal 50 (DL50) de 41.016 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto etanólico de *Piper nigrum* entera y de 16.041 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto etanólico de *Piper nigrum* molida. La cantidad para los resultados son el promedio de 2 repeticiones del ensayo, con significancia mayor a .150, ya que la significancia de *Piper nigrum* entera fue de .785 y *Piper nigrum* molida de .911. De acuerdo con el criterio de toxicidad establecido se consideraron ambos extractos como tóxicos.

Tabla VIII. Pruebas de chi-cuadrado Piper nigrum entera

		Chi-cuadrado	gl ^b	Sig.
PROBIT	Prueba de bondad de ajuste de Pearson	15.723	21	.785 ^a

a. Puesto que el nivel de significación es mayor que .150, no se utiliza el factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

b. Las estadísticas basadas en casos individuales difieren de las estadísticas basadas en casos agregados.

Tabla IX. Límites de confianza (95% de límites de confianza para Dosis) Piper nigrum entera

	PROBABILIDAD 0.5
REPETICIÓN 1	43.707
REPETICIÓN 2	38.324
PROMEDIO DL50	41.016

Tabla X. Pruebas de chi-cuadrado Piper nigrum molida

		Chi-cuadrado	gl ^b	Sig.
PROBIT	Prueba de bondad de ajuste de Pearson	12.946	21	.911 ^a

a. Puesto que el nivel de significación es mayor que .150, no se utiliza el factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

b. Las estadísticas basadas en casos individuales difieren de las estadísticas basadas en casos agregados.

Tabla XI. Límites de confianza (95% de límites de confianza para Dosis) Piper nigrum molida

	PROBABILIDAD 0.5
REPETICIÓN 1	17.183
REPETICIÓN 2	14.899
PROMEDIO DL50	16.041

7. DISCUSIÓN

Además de la extracción Soxhlet y la técnica de maceración se han utilizado otros métodos alternativos para la extracción de alcaloides en plantas. Una de ellas es la extracción líquida a presión, la cual ha demostrado ser efectiva y rápida y puede ser considerada como un método alternativo (Urbanová *et al*, 2012). Sin embargo, debido a su costo y a que han sido técnicas empleadas desde hace muchos años, en esta investigación solo se utilizó la técnica de extracción mediante maceración para *P. nigrum* molida y entera.

Para el análisis fitoquímico de *Piper nigrum* se ha utilizado la técnica de cromatografía en capa fina y n-hexano y ethyl acetato como sistema eluyente (de Souza Grinevicius *et al*, 2016), la misma técnica se utilizó en esta investigación. A pesar de que las pruebas de citotoxicidad son de en otros estudios la actividad citotóxica de *Piper nigrum* fue medida mediante el ensayo MTT evaluado por triplicado (de Souza Grinevicius *et al*, 2016). Contiene principalmente almidón, su constituyente más importante son las resinas en las que se halla un alcaloide, Piperina (León, 1968). El resultado obtenido coincide con previas estudios ya que se encontraron compuestos como: grupo carboxilo, oxidrilos fenólicos (Taninos) y alcaloides.

Se ha medido la actividad antimicrobiana de *Piper nigrum* contra bacterias gram negativas y gram positivas (Noumedem *et al*, 2013). El extracto de *Piper nigrum* L. ha demostrado excelente inhibición del crecimiento de bacterias Gram positivas. En un estudio realizado por (Karsha y Lakshmi, 2013) se obtuvieron halos de inhibición de 14mm, a una concentración del extracto de 1g/ml de DMSO, contra *Staphylococcus aureus*, de 12mm *Bacillus cereus*, y 15 contra *Streptococcus faecalis*. Una concentración mínima inhibitoria de 125ppm contra *S. aureus*, de 62.5ppm contra *B. cereus*, y de 125ppm contra *S. faecalis*. Sin embargo, se decidió medir su actividad antimicrobiana contra *S. mutans* y *S. sobrinus* ya que no existe evidencia científica de la actividad antimicrobiana de *Piper nigrum* contra estas bacterias de interés odontológico. En la prueba de sensibilidad en disco se encontró poder antibacteriano de los extractos etanólicos de *Piper nigrum* entera y molida contra cepas de *S. mutans*, con una media de

9.33mm en el extracto de Pimienta molida a una concentración de 1000 µg/µL y una CMI de 400 µg/mL. Además, para el extracto etanólico de Pimienta molida frente a la bacteria de *Streptococcus sobrinus* la CMI de 150 µg/mL. Lo cual corrobora que el extracto de *Piper nigrum* tiene poder antimicrobiano contra bacterias Gram positivas.

En una investigación, a través de un ensayo de letalidad de *Artemia salina*, se encontró una DL50 de la Piperina en 2.4 (Padmaja *et al*, 2002). La Piperina es el compuesto principal de *Piper nigrum*, sin embargo, en el presente estudio se evaluaron los extractos puros. Se obtuvo una mayor DL50 para los extractos, resultando menos tóxicos que lo documentado referente a la Piperina. Se encontró una DL50 de 41.016 µg/mL para para el extracto de *Piper nigrum* entera y de 16.041 µg/mL para el extracto de *Piper nigrum* molida.

8. CONCLUSIONES

El área de estudio de los productos naturales tiene gran potencial, pero aún no se ha explorado en su totalidad. Con el objetivo de ampliar el conocimiento en este rubro, en esta investigación, se realizaron pruebas a los extractos etanólicos de *Piper nigrum* entera y molida para determinar su potencial en Odontopediatría.

Se obtuvo el extracto etanólico de *Piper nigrum*, molida y entera mediante la técnica de maceración, este proceso permitió conservar los componentes del fruto y obtener una concentración de los mismos para su posterior evaluación.

Mediante la caracterización fitoquímica de los extractos se encontraron:

- Alcaloides, lo cual podría indicar un potencial uso como analgésico.
- Taninos, lo que muestra un posible uso en Odontopediatría como hemostático y antiséptico.
- Grupo carboxilo, que generalmente son ácidos débiles.

Ya que los extractos presentaron actividad antimicrobiana contra bacterias de interés odontológico (*S. sobrinus* y *S. mutans*) se recomienda su posterior evaluación para la elaboración de coadyuvantes para el mejoramiento y preservación de la salud oral.

Los extractos resultaron ser tóxicos a las concentraciones analizadas, es por eso que recomienda realizar futuras investigaciones en las cuales se ajusten las dosis y se realicen pruebas adicionales para medir su toxicidad.

9. LITERATURA CITADA

- Ahmad N, Fazal H, Abbasi BH, Farooq S, Ali M, Khan MA. Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper): A review. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2012;2(3):S1945-S1953.
- Azuola R, Vargas-Aguilar P. Extracción de sustancias asistida por ultrasonido. *Revista Tecnología en Marcha*. 2007;20(4).
- Ballinas Solís A, Durán García R, Mejía Gutiérrez A, Méndez Velázquez R, Rubalcava Guillén A. *Uso de la herbolaria en Chiapas en el área odontológica*. 1era. ed. México: UNICACH; 2013.
- Castro C. Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria. *Rev Cubana Plant Med*. 2006;11(2).
- Chaiya A, Saraya S, Chuakul W, Temsiririrkkul R. Screening for dental caries: Preventive activities of medicinal plants against *Streptococcus mutans*. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013;40(1):9-17.
- Cona, T. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Revista chilena de infectología*. 2002;19,77-81.
- Da Cruz Cabral L, Fernández Pinto V, Patriarca A. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *Int J Food Microbiol*. 2013;166(1):1-14.
- De Estrada J, Quiñonez J, Fuentes I. Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. *Rev Cubana Estomatol*. 2019;43(1):47-55.
- de Souza Grinevicius VM, Kwiecinski MR, Santos Mota NS, Ourique F, Porfirio Will Castro LS, Andregueti RR, Gomes Correia JF, Filho DW, Pich CT, Pedrosa RC. *Piper nigrum* ethanolic extract rich in piperamides causes ROS overproduction, oxidative damage in DNA leading to cell cycle arrest and apoptosis in cancer cells. *J Ethnopharmacol*. 2016;189:139-147.
- Debnath M, Khandelwal M, Lal P, Jain R. Evaluation of Heavy Metal Distribution and Antibacterial Activities of Medicinal Plants *Tinospora cordifolia*, *Ocimum sanctum* and *Piper nigrum* International. *IJPSSDR*. 2014;6(3):229-234.

Déciga-Campos M, Rivero-Cruz I, Arriaga-Alba M, Castañeda-Corral G, Angeles-López GE, Navarrete A, Mata R. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Ethnopharmacol.* 2007;110(2):334-342.

Derosa G, Maffioli P, Sahebkar A. Piperine and Its Role in Chronic Diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2016;928:173-184.

Escobar L, Rivera A. Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Vitae.* 2010;17(1), 67-74.

Garcés J, García E, Salas L. Streptococcus mutans y caries dental (Streptococcus mutans and dental caries). *Ces Odontología.* 2013;26(1):44-56.

Gayatri Nahak and R.K. Sahu. Phytochemical Evaluation and Antioxidant activity of Piper cubeba and Piper nigrum. *J Pharm Sci.* 2011;01(08):153-157.

González R, Cardentey J. La medicina herbolaria como terapéutica en un consultorio. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río.* 2016;20(2): 20-27.

Guillen J. Uso de herbolaria para afecciones bucales en una población de Nayarit, México. *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina.* 2017;16.

Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of Medicine.* 2006;27(1):91-93.

Hritcu L, Noumedem JA, Cioanca O, Hancianu M, Postu P, Mihasan M. Anxiolytic and antidepressant profile of the methanolic extract of Piper nigrum fruits in beta-amyloid (1–42) rat model of Alzheimer's disease. *Behav. Brain Funct.* 2015;11(1):13.

Hu Q, Zhang J, Xu C, Li C, Liu S. The Dynamic Microbiota Profile During Pepper (Piper nigrum L.) Peeling by Solid-State Fermentation. *Curr Microbiol.* 2017;74(6):739-746.

Jagella, T, Grosch W. Flavour and off-flavour compounds of black and white pepper (Piper nigrum L.) III. Desirable and undesirable odorants of white pepper. *European Food Research and Technology.* 1999;209(1):27-31.

Joy B, Sandhya CP, Remitha KR. Comparison and bioevaluation of Piper longum fruit extracts. *J Chem Pharm Res.* 2014;2(4):696-706.

Jyoti S, Pavanalakshmi GP. Nutritive and Non-Nutritive Sucking Habits- Effect on the Developing Oro- Facial Complex; A Review. *Dentistry.* 2014;4(3):203.

Karsha PV, Lakshmi OB. Antibacterial activity of black pepper (*Piper longum* Linn.) with special reference to its mode of action on bacteria. *Ind J of Nat Prod & Res.* 2013;1(2):213-215.

Khaliq T, Sarfraz M, Ashraf MA. Recent Progress for the Utilization of *Curcuma longa*, *Piper nigrum* and *Phoenix dactylifera* Seeds against Type 2 Diabetes. *West Indian Med J.* 2015;64(5):527-532.

Khan M, Siddique. Antimicrobial activity of piper fruits. *Nat Prod Rad.* 2013;6(2):111-113.

Khawas S, Nosál'ová G, Majee SK, Ghosh K, Raja W, Sivová V, Ray B. In vivo cough suppressive activity of pectic polysaccharide with arabinogalactan type II side chains of *Piper nigrum* fruits and its synergistic effect with piperine. *Int J Biol Macromol.* 2017;99:335-342.

Leesombun A, Boonmasawai S, Shimoda N, Nishikawa Y. Effects of Extracts from Thai Piperaceae Plants against Infection with *Toxoplasma gondii*. *PLoS One.* 2016 May 23;11(5):e0156116.

León J. Botánica de los cultivos tropicales. 3era ed. San José, Costa Rica: Editorial Agroamerica; 2000.

León Mendoza C. Determinación de la acción antifúngica de los aceites esenciales de pimienta negra (*piper nigrum*), romero (*rosmarinus officinalis*) y orégano (*origanum vulgare*) sobre hongos post cosecha en ají paprika (*capsicum annum* L.) [Internet]. Lima, Perú; 2017. Disponible en:
http://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/urp/1000/Leon_c.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Li Z, Zu C, Wang C, Yang J, Yu H, Wu H. Different responses of rhizosphere and non-rhizosphere soil microbial communities to consecutive *Piper nigrum* L. monoculture. *Sci Rep.* 2016;6:35825.

Meghwal M, Goswami TK. *Piper nigrum* and piperine: an update. *Phytother Res.* 2013;27(8):1121-1130.

Molnar M, Mendešević N, Šubarić D, Banjari I, Jokić S. Comparison of various techniques for the extraction of umbelliferone and herniarin in *Matricaria chamomilla* processing fractions. *Chem Cent J.* 2017;11(1):78.

Ngo QM, Tran PT, Tran MH, Kim JA, Rho SS, Lim CH, Kim JC, Woo MH, Choi JS, Lee JH, Min BS. Alkaloids from *Piper nigrum* Exhibit Antiinflammatory Activity via Activating the Nrf2/HO-1 Pathway. *Phytother Res.* 2017;31(4):663-670.

Nitola L, Muñoz D, Patiño O, Prieto J. Caracterización fitoquímica y evaluación de actividad inhibitoria sobre acetilcolinesterasa de hojas de *Piper pesaresanum*. *Rev Cubana Plant Med.* 2016; 21(4):1-10.

Noumedem JA, Mihasan M, Kuiate JR, Stefan M, Cojocar D, Dzoyem JP, Kuete V, Núñez I, Tomapasca J, Vergara M, Ipanaque K, Cabrejos C. Efecto del yogurt, leche y jugo de toronja sobre la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de Ciprofloxacina frente a *Escherichia coli* aislada de infecciones del tracto urinario. *Rev Científica.* 2019;(9)2:1-15.

Padmaja R, Arunb PC, Prashantha D, Deepak M, Amita A, Anjana M. Brine shrimp lethality bioassay of selected Indian medicinal plants. *Fitoterapia.* 2002;73(6):508-510.

Pérez Quiñones JA, Duque de Estrada Riverón J, Hidalgo Gato-Fuentes I. Asociación del *Streptococcus mutans* y lactobacilos con la caries dental en niños. *Revista Cubana de Estomatología.* 2007;44(4).

Pino Pérez O, Jorge Lazo F. Ensayo de artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Rev. Protección Veg.* 2010;25(1):34-43.

Raman G, Gaikar VG. Extraction of piperine from *Piper nigrum* (black pepper) by hydrotropic solubilization. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2002;41(12), 2966-2976.

Ravindran PN, Kallapurackal JA. Handbook of Herbs and Spices [Internet]. India: Indian Institute of Spices Research; 2012 [revisión 2012; consultado 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780857090393500062>.

Sánchez L, Neira A. Bioensayo General de Letalidad en *Artemia Salina*, a Las Fracciones del Extracto Etanólico De *Psidium Guajava*. L y *Psidium Guineense*. *Sw. Cultura Científica.* 2011;3(3):40-45.

Shetty R. M, Shetty, M., Shetty, N. S., & Deoghare, A. Three-Alarm System: Revisited to treat Thumb-sucking Habit. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2015;8(1):82–86.

Shetty R. M, Shetty, M., Shetty, N. S., & Deoghare, A. Three-Alarm System: Revisited to treat Thumb-sucking Habit. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2015;8(1):82–86.

- Sindhu S, Manorama S, Alfamol PM. Preliminary phytochemical analysis and antimicrobial activity of *Piper longum* L. (Piperaceae) Mintage. *J of Pharma & Med Sci*. 2013;2(1):21-23.
- Singh C, Rai NP. In-vitro Antibacterial Activity of *Piper longum* L. Fruit. *Int. J. Pharm Sci Rev Res*. 2013;18(2):89-91.
- Subramanian R, Subbramaniyan P, Ameen JN, Raj V. Double bypasses soxhlet apparatus for extraction of piperine from *Piper nigrum*. *Arab. J. Chem*. 2016;9:S537-S540.
- Taheri JB, Azimi S, Rafeian N, Zanjani HA. Herbs in dentistry. *Int Dent J*. 2011;61(6):287-96
- Tammina SK, Mandal BK, Ranjan S, Dasgupta N. Cytotoxicity study of *Piper nigrum* seed mediated synthesized SnO₂ nanoparticles towards colorectal (HCT116) and lung cancer (A549) cell lines. *J Photochem Photobiol B*. 2017;166:158-168.
- Tammina SK, Mandal BK, Ranjan S, Dasgupta N. Cytotoxicity study of *Piper nigrum* seed mediated synthesized SnO₂ nanoparticles towards colorectal (HCT116) and lung cancer (A549) cell lines. *J Photochem Photobiol B*. 2017;166:158-168.
- Verastegui G, Omaña P, Hernández Y, Márquez R, Aranda S. Resolución de succión digital persistente mediante un abordaje psicológico. Reporte de un caso. *AMOP*. 2014;26(1):25-29.
- Verastegui G, Omaña P, Hernández Y, Márquez R, Aranda S. Resolución de succión digital persistente mediante un abordaje psicológico. Reporte de un caso. *AMOP*. 2014;26(1):25-29.
- Zerón A. La nueva clasificación de enfermedades periodontales. *Rev ADM*. 2018;75(3):122-124.

RESUMEN BIOGRÁFICO

C. D. María Andrea Guajardo Barbosa

Candidato para el Grado de
Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontopediatría

Tesis: EVALUACIÓN DE *Piper nigrum* (PIMIENTA NEGRA) Y SU POTENCIAL
USO EN ODONTOPEDIATRÍA

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 12 de Julio de 1990, hija de
Enrique Raúl Guajardo Moreno y Olga Barbosa Salazar.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido
Cirujano Dentista en 2015 con mención honorífica.